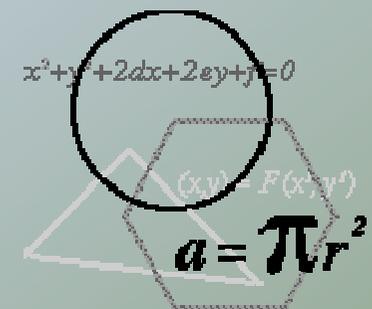


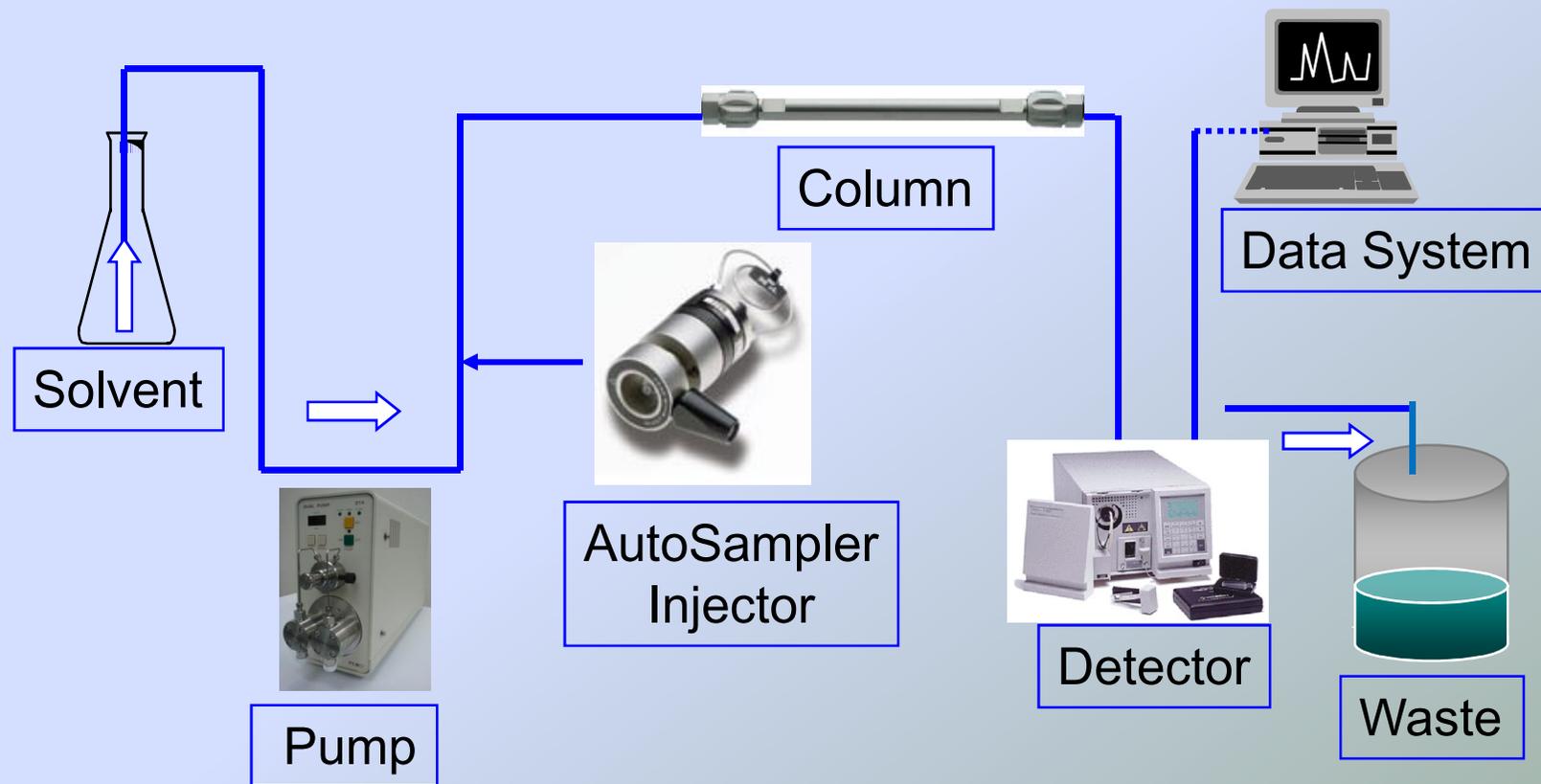
HPCPC Basic Theory

BuKi Cho

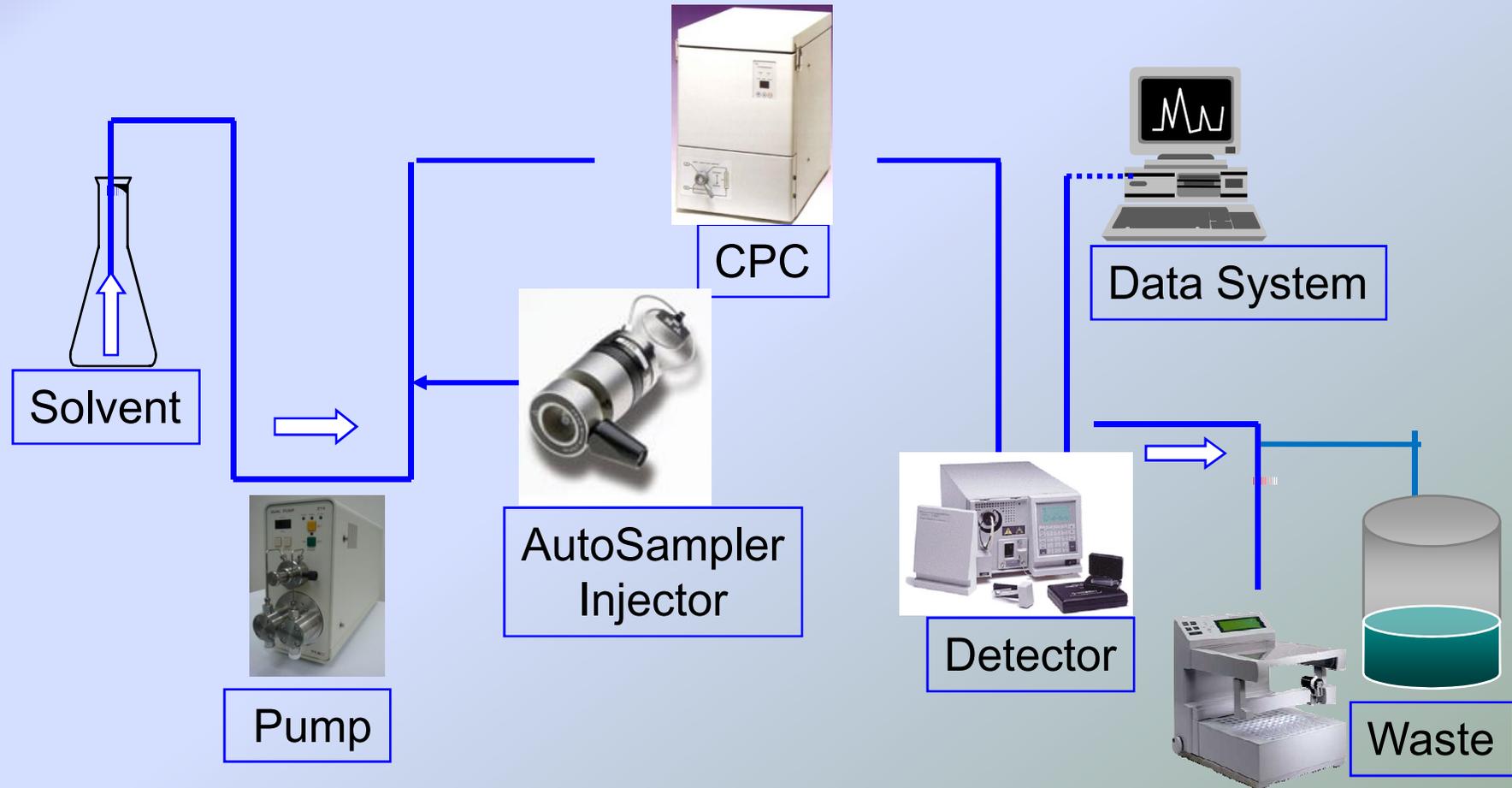
2009. Jul



HPLC System의 구성



Prep CPC System의 구성



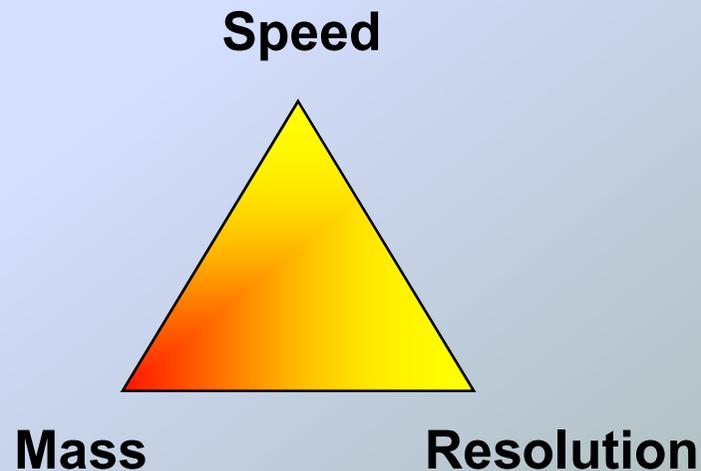
HPCPC

(High Performance Centrifugal Partition Chromatography)



Prep?

- ▶ **Preparative**는 시료 **components**의 **isolation** 과 **purification** 을 위한 크로마토그래피의 응용이다..
- ▶ **Isolation protocol**은 혼합 시료로 부터 정제된 **Components**를 **fraction**을 하기 위한 목적이다.



HPCPC ?

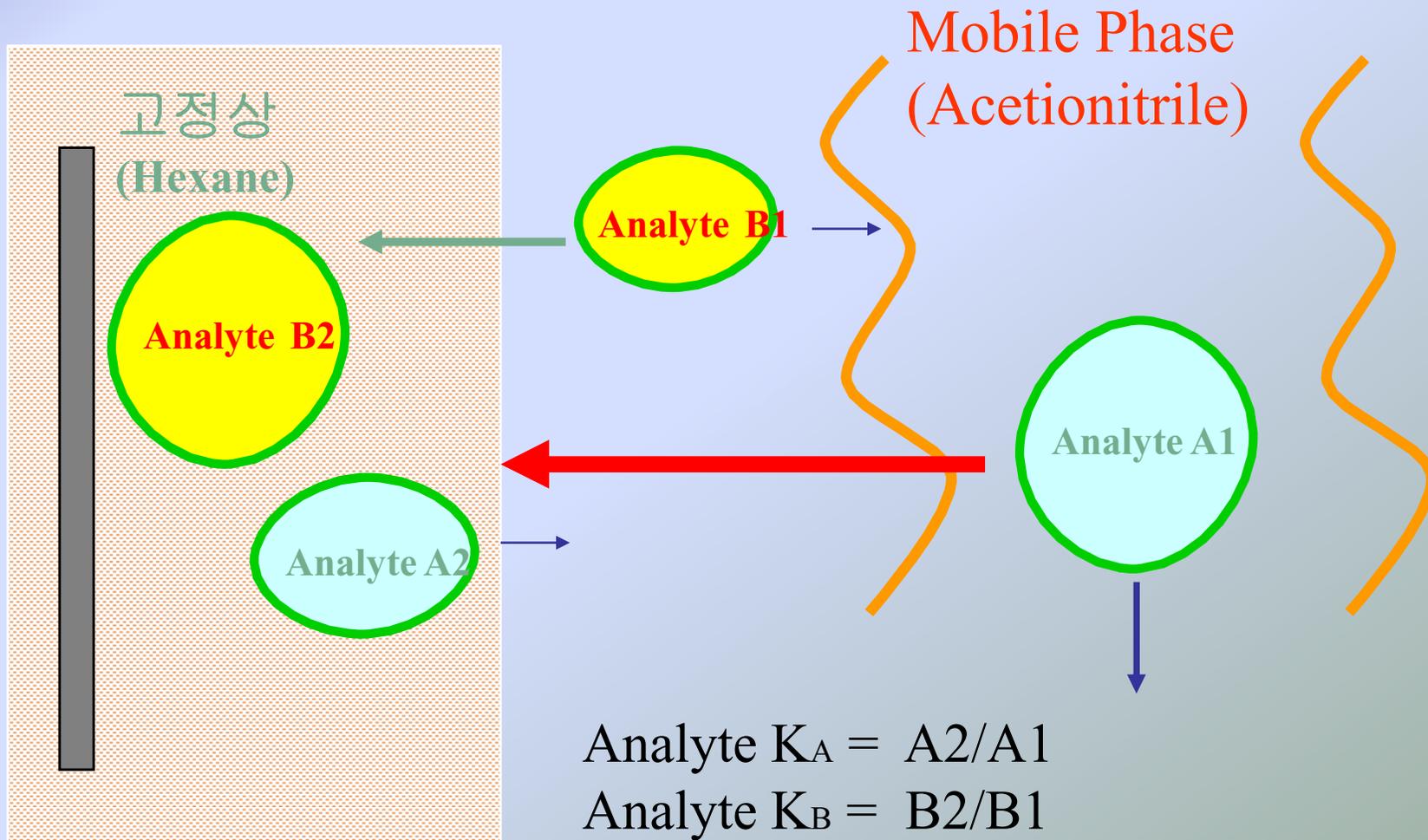
적당한 매체로 유지시킨 물 또는 각종 유기용매와 이동상 사이에서 분배되는 용질의 분배계수의 차이로 분리하는 방법

분배계수 ?

서로 혼합하지 않는 두 액상 사이의 용질 농도를 각각 C_1, C_2 라 할 때, 둘 사이의 비 C_1 / C_2 는 농도에 상관없이 항상 일정

A물질의 분배계수가 B물질의 분배계수보다 작다고 가정하면 B가 A보다 어떤 고정상에 들어가기 쉽다. 그러므로 두 혼합물을 적당한 용매로 이동할 때 A가 보다 많이 이동상인 용매로 들어가므로, B보다 A가 빨리 이동하게 된다. 이동상인 용매를 계속 흐르게 하면 이동속도가 큰 A와 이동속도가 작은 B는 서로 떨어져 분리된다.

분배 계수 ?



$$\text{Analyte } K_A = A2/A1$$

$$\text{Analyte } K_B = B2/B1$$

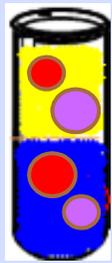
$$K_A < K_B$$

HPCPC

(High Performance Centrifugal Partition Chromatography)

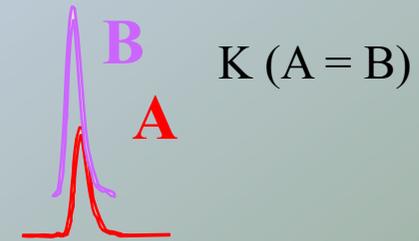
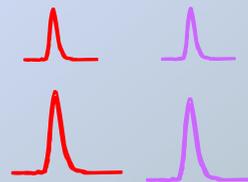
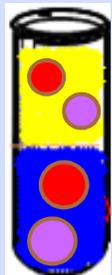
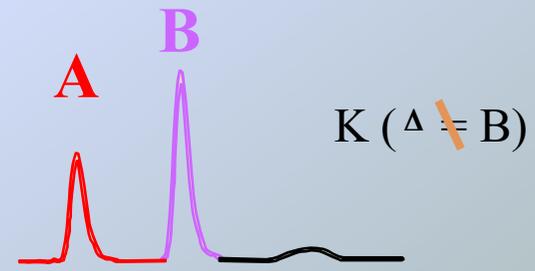
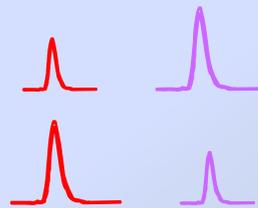
고정상으로서 사용된 액체와 이동상인 것으로의 용질의 분배 비율이 다름을 이용 (분배계수의 차이 또는 용해도의 차이)

A, B compound



상층(lighter)

하층(heavier)

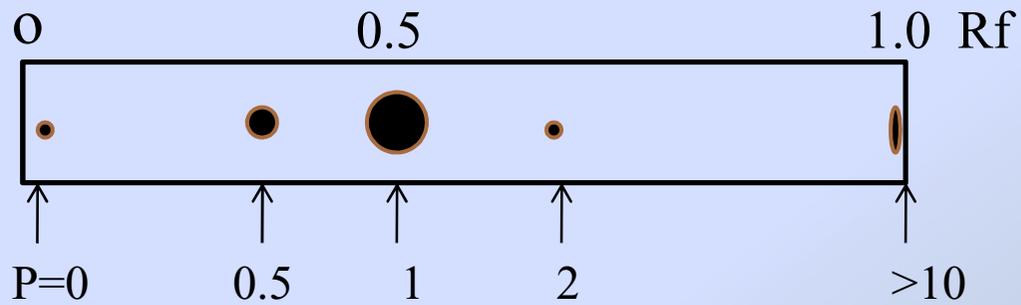


Acetonitrile (이동상으로 사용)

Hexane (고정상으로 사용)

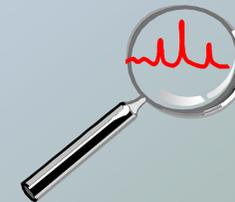
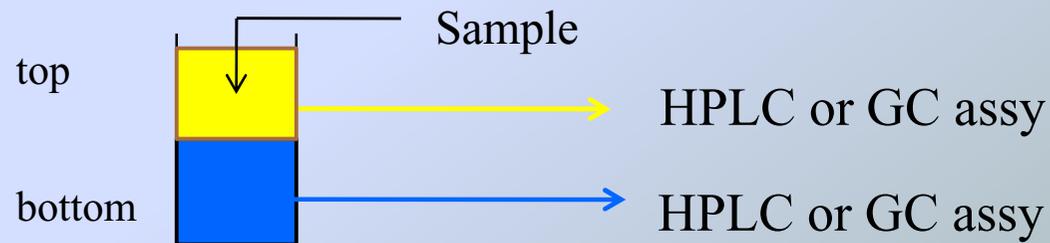
K 측정

TLC assay



P=Con. In less polar phase / Con. In polar phase

HPLC or GC assay



두 피크의 면적을
나눈 값이 K

TLC vs HPLC

TLC

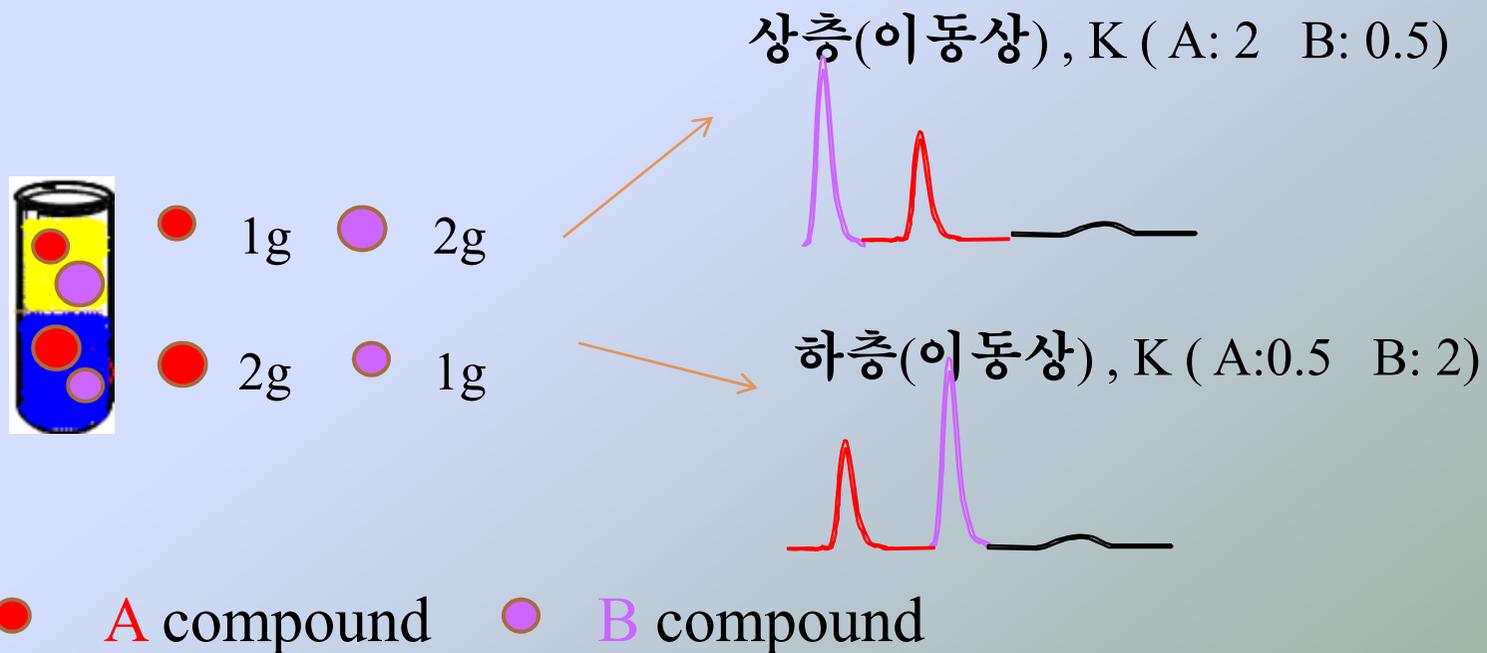
- 분석 조건의 Guide Line을 제시
- 사용법이 용이 하지만 Simple 하기 때문의 주의가 필요함.
- Resolution이 Silica gel 40um에 해당
- Sample matrix가 Simple 할 경우 용이
- Matrix가 복잡할 경우 겹치거나 안보일 수 있음
- TLC에 확인한 분석 조건을 HPLC로 가더라도 사용된 Column에 따라 달라 질 수 있음.
- HPLC에서는 조건을 잡기 위해서는 UV,RI,ELSD,ECD등이 필요하나 TLC에서는 검출기의 제한없이 사용 가능함.

HPLC

- Resolution이 좋음
- Sample matrix가 복잡할 경우 TLC 보다 분리 조건 확인이 좋음.
- TLC로 Scan한 후 HPLC로 세부적인 조건을 잡을 수 있음. 즉 TLC와 LC를 같이 사용 가능함.

K 측정

$$K = \frac{\text{(solute concentration in the stationary)}}{\text{(solute concentration in the mobile phase)}}$$



K에 의한 이동상 선택

예)

$K = 1.5$ 1 3 3.3 (상층 : 이동상)

$K = 0.2$ 0.3 0.5 (하층 : 이동상)

K 값이 1 보다 크다는 것은 Solute가 상층부로 많이 Concentration 되어 있으므로 상층부를 이동상으로 사용하여 Solute의 Retention을 당겨 준다. 실제로 K 값은 작은 값을 가짐.

용매 조성 비율에 따른 K 변화

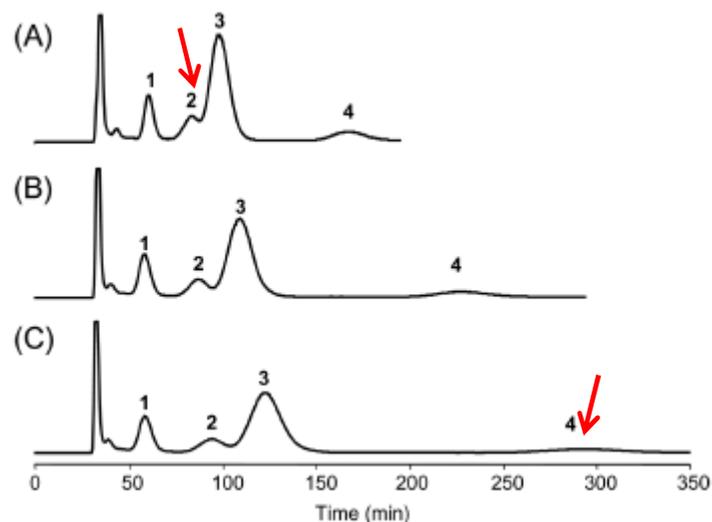
Solvent system	Volume ratio (v/v)	Partition coefficient (K) value			
		1 ^{a)}	2 ^{b)}	3 ^{c)}	4 ^{d)}
<i>n</i> -hexane- <i>n</i> -butanol-water	3:4:7	10.70	2.66	1.85	0.38
Ethyl acetate- <i>n</i> -butanol-water	1:1:2	>10	>10	>10	9.28
Ethyl acetate- <i>n</i> -butanol-methanol-water	5:5:1:10	>10	>10	>10	7.23
Ethyl acetate- <i>n</i> -butanol-methanol-water	5:10:2:20	>10	>10	>10	>10
Chloroform-methanol-isopropanol-water	5:6:1:4	0.59	0.99	1.49	3.15
Chloroform-methanol-isopropanol-water	7:6:1:4	0.53	1.40	2.19	4.86
Chloroform-methanol-isopropanol-water	9:6:1:4	0.53	1.76	2.60	5.62

a) Prosapogenin A of dioscin.

b) Dioscin.

c) Deltonin.

d) Diosgenin 3-O-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)]- β -D-glucopyranoside.

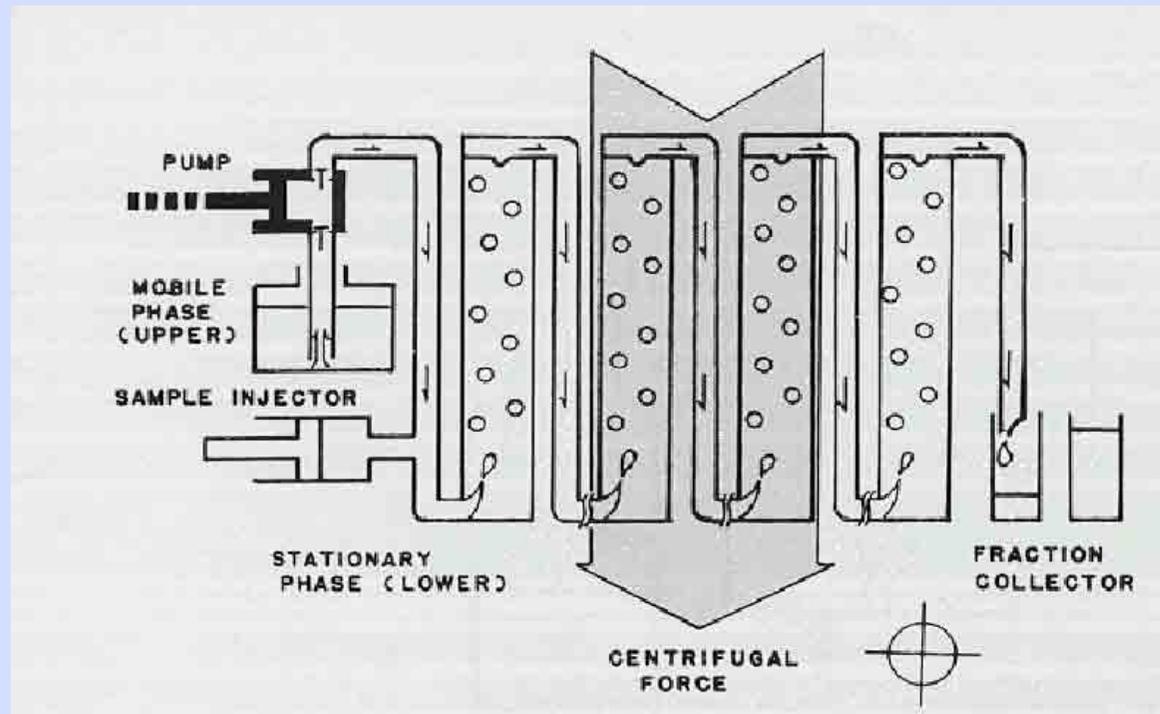


chloroform-methanol-isopropanolwater
v/v systems as 5:6:1:4 (A)

7:6:1:4 (B)

9:6:1:4 (C)

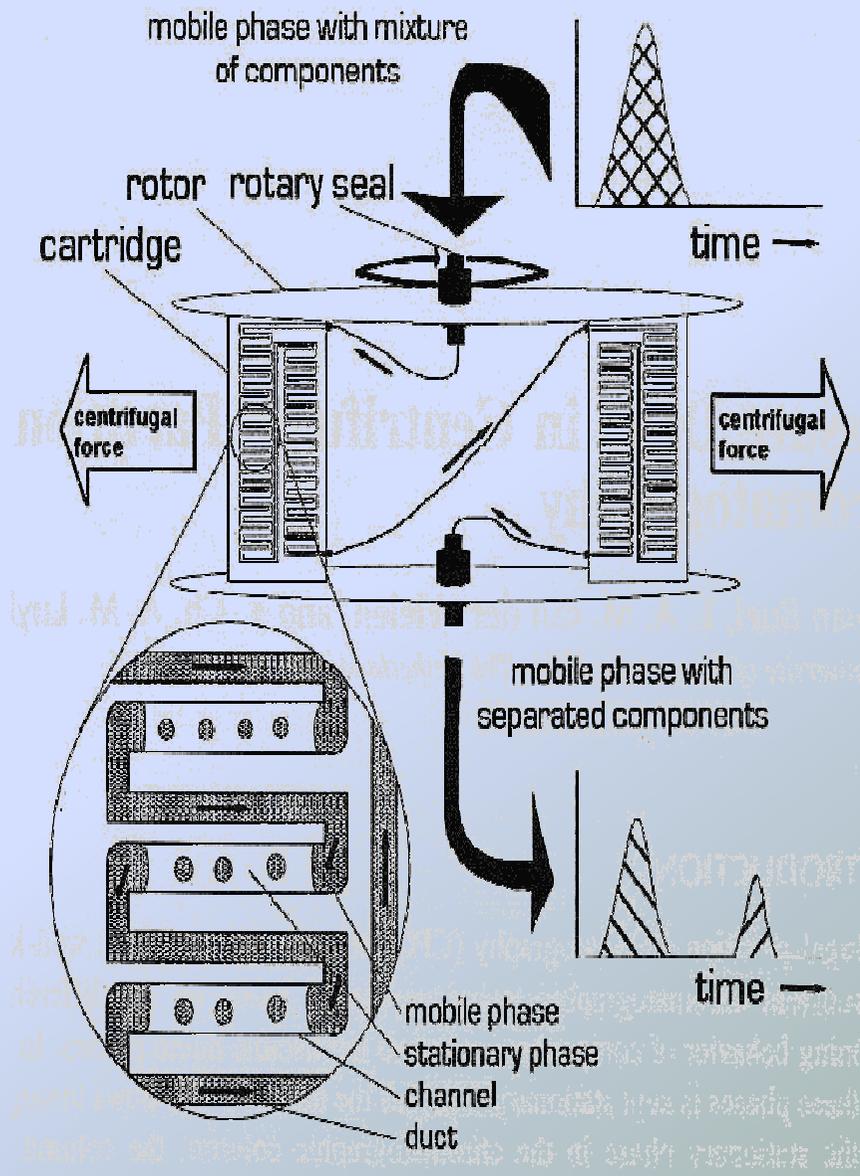
Ascending / Descending mode ?



Density 차이

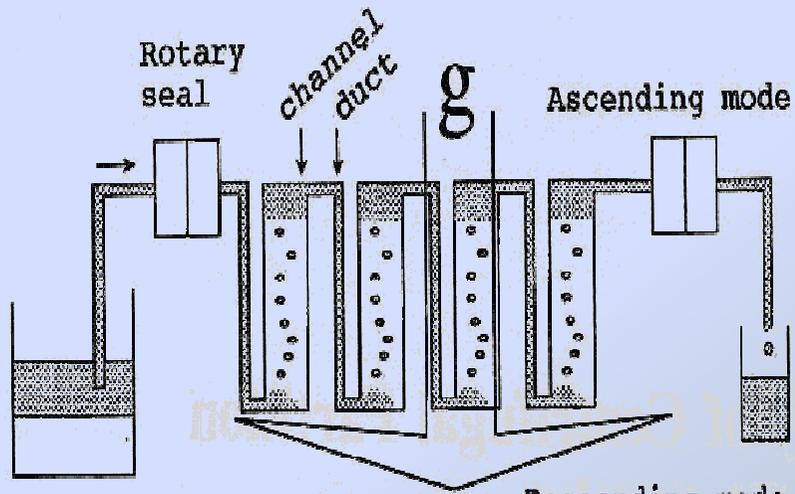
mobile phase passes through the stationary phase forming fine droplets

Ascending / Descending mode ?

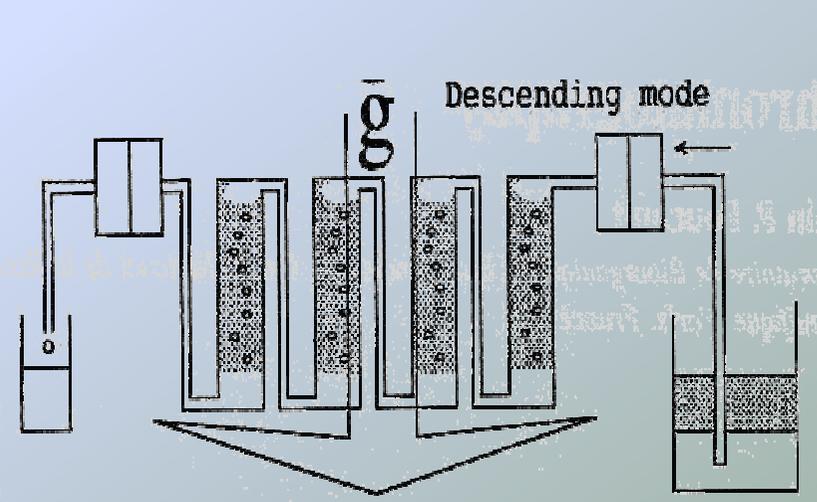


Ascending / Descending mode ?

Ascending mode



Descending mode



중력

이동상/고정상 선택에 의한 Mode 선택 ?

Ascending mode : Mobile Phase = Top(lighter) phase
Stationary Phase = Bottom(heavier) phase

Descending mode : Mobile Phase = Bottom(heavier) phase
Stationary Phase = Top(lighter) phase

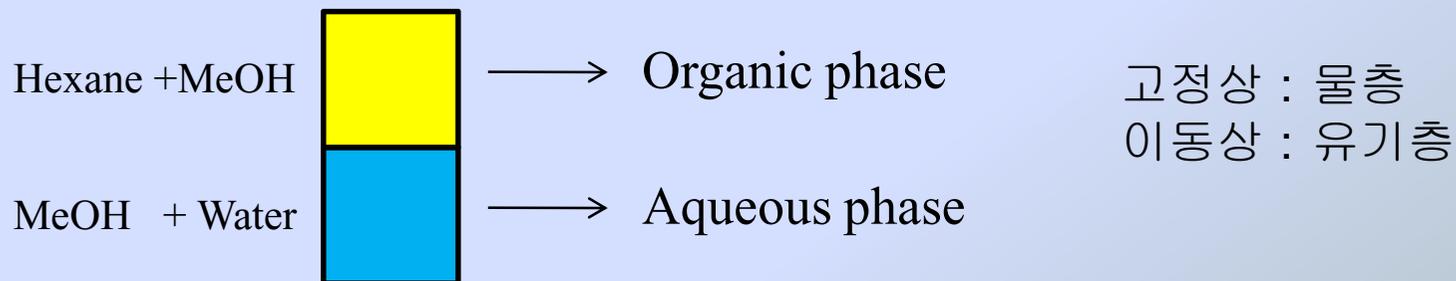
이동상이 상층이면 Ascending mode

이동상이 하층이면 Descending mode

이동상/고정상 선택에 의한 Mode 선택 ?

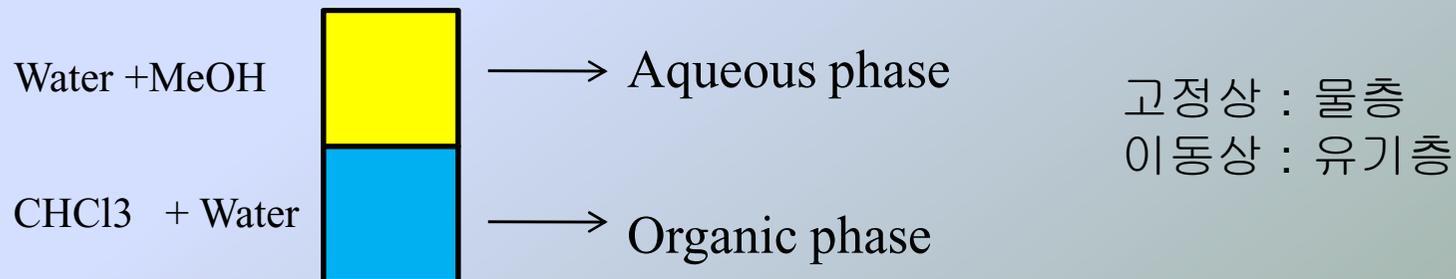
예) Hexane – Methanol – water

Ascending mode (Normal)

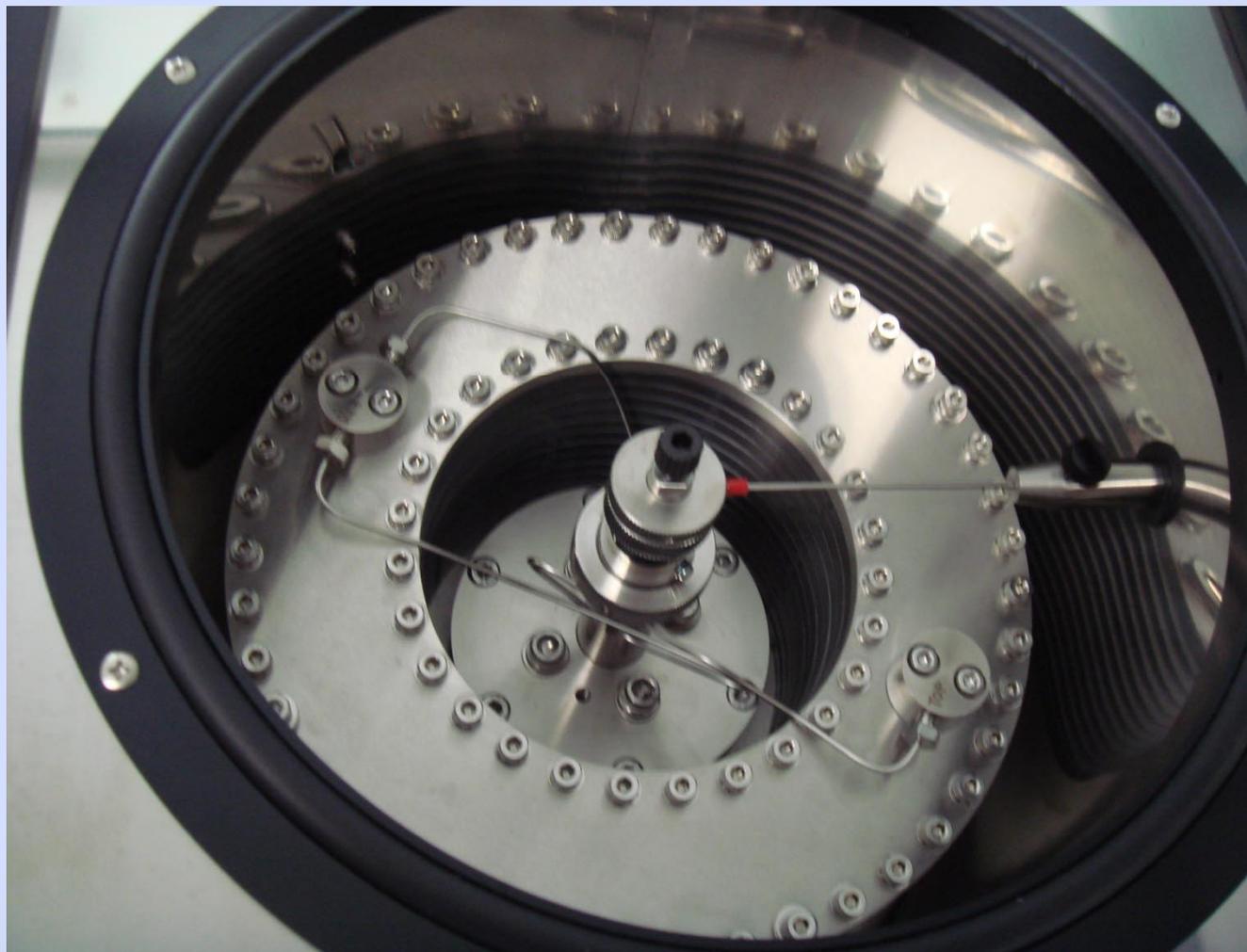


예) CHCl₃ – Methanol – water

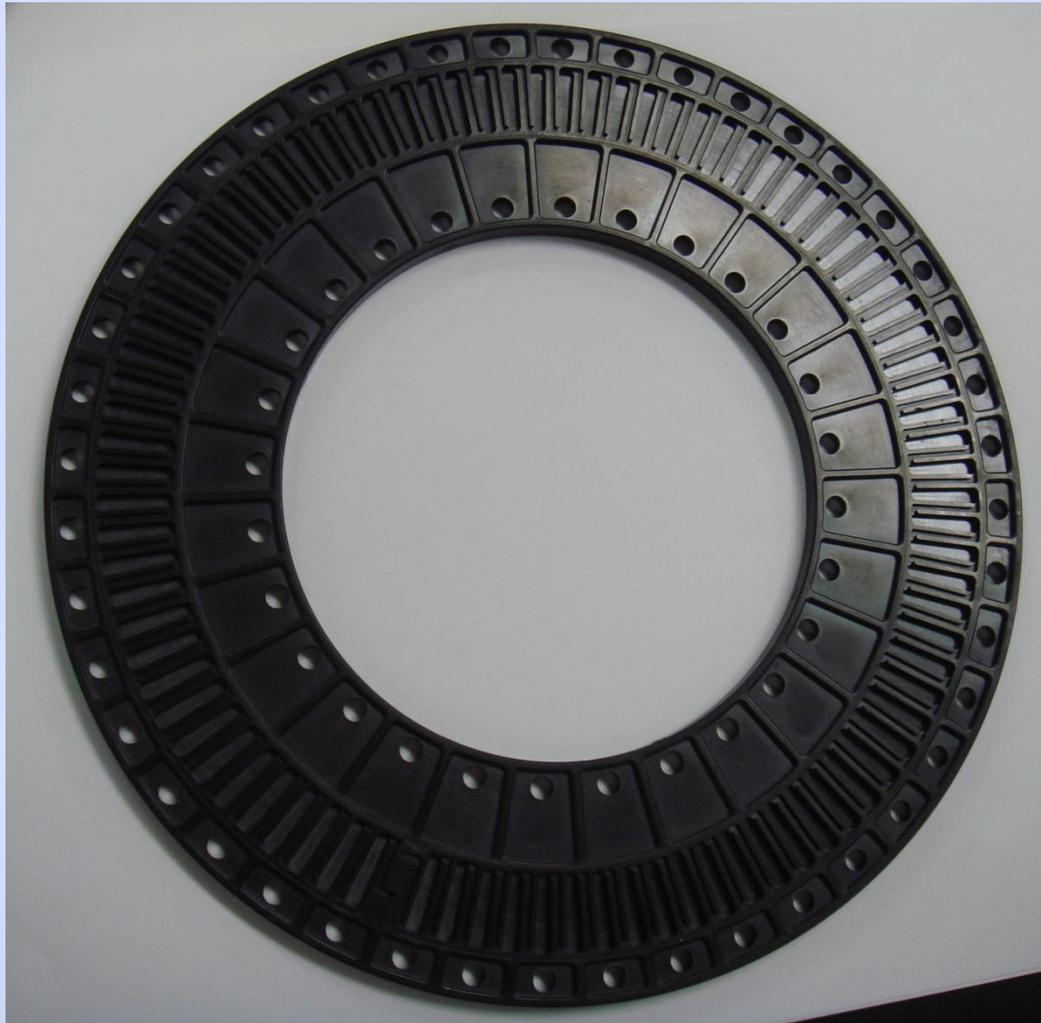
Descending mode (Normal)



HPCPC Rotor



Partition Channels



Partition Channels for 240ml

$$V_r = V_m + KV_s = V_m + K(V_t - V_m)$$

$$V_t = V_m + V_s$$

V_r : Solute retention volume

V_m : Mobile phase volume

V_s : Stationary phase volume

K : Partition coefficient

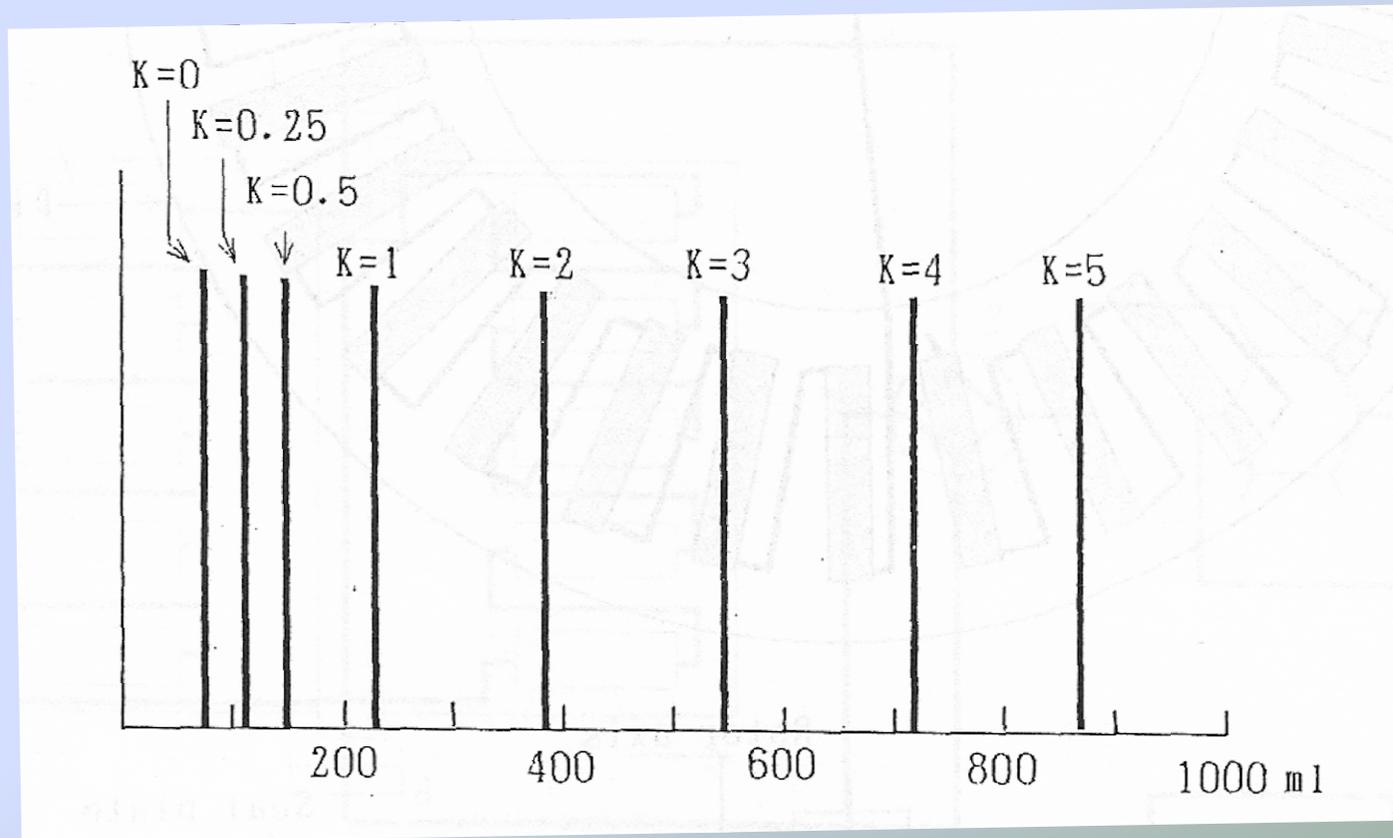
V_t : Total internal volume of partition channels



Partition Coefficient vs Retention Volume

$V_t = 230\text{ml}$, $V_m = 70\text{ml}$

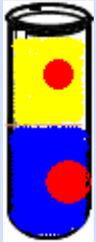
$V_s = 160\text{ml}$



Test 실험 예

Two phase system

Top phase(**n-hexane**) - 고정상



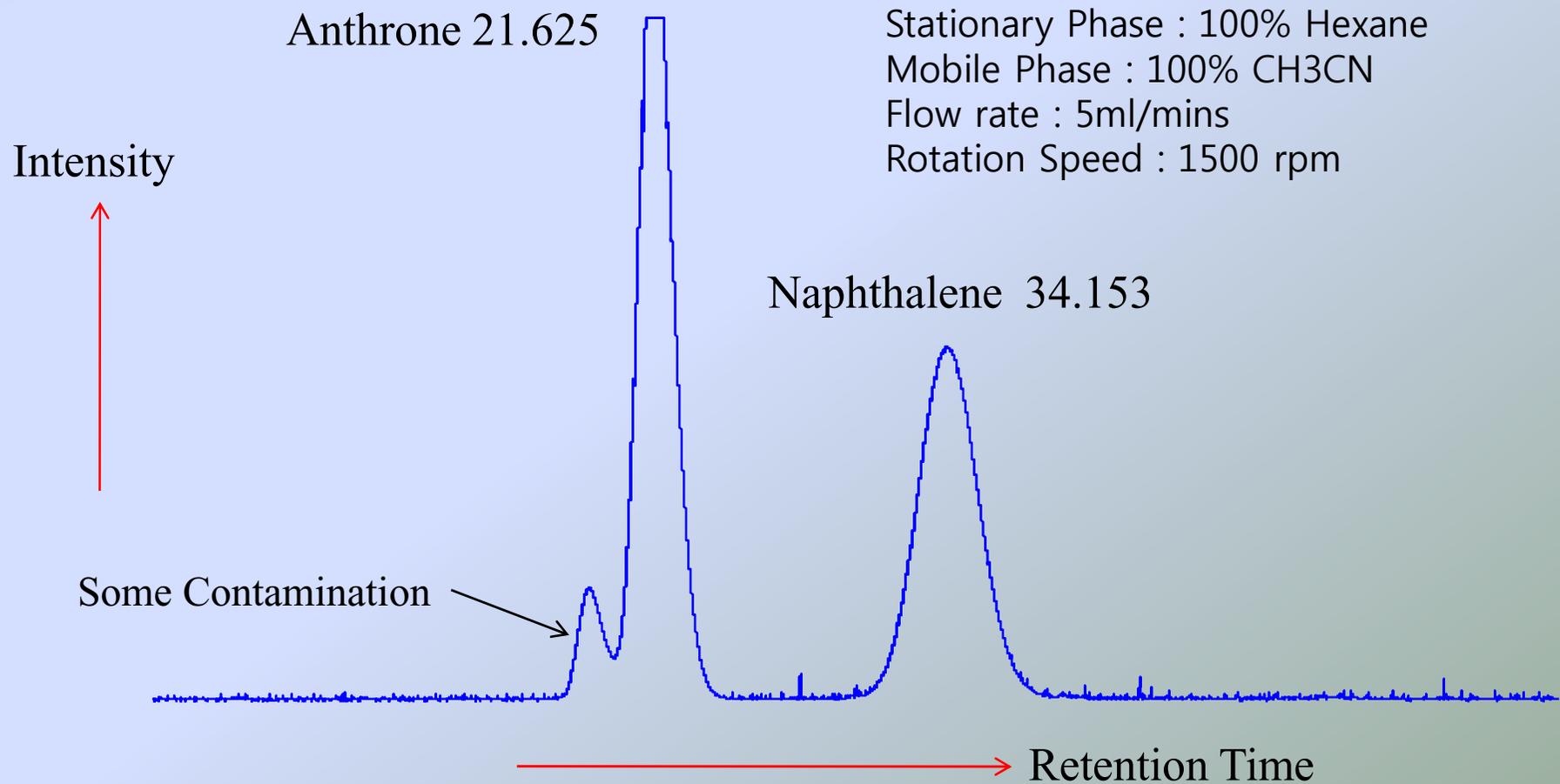
Bottom phase(**acetonitrile**) - 이동상

표준 시료

Anthrone	40mg
Naphthalene	100mg
N-dodecylbenzene	3ml

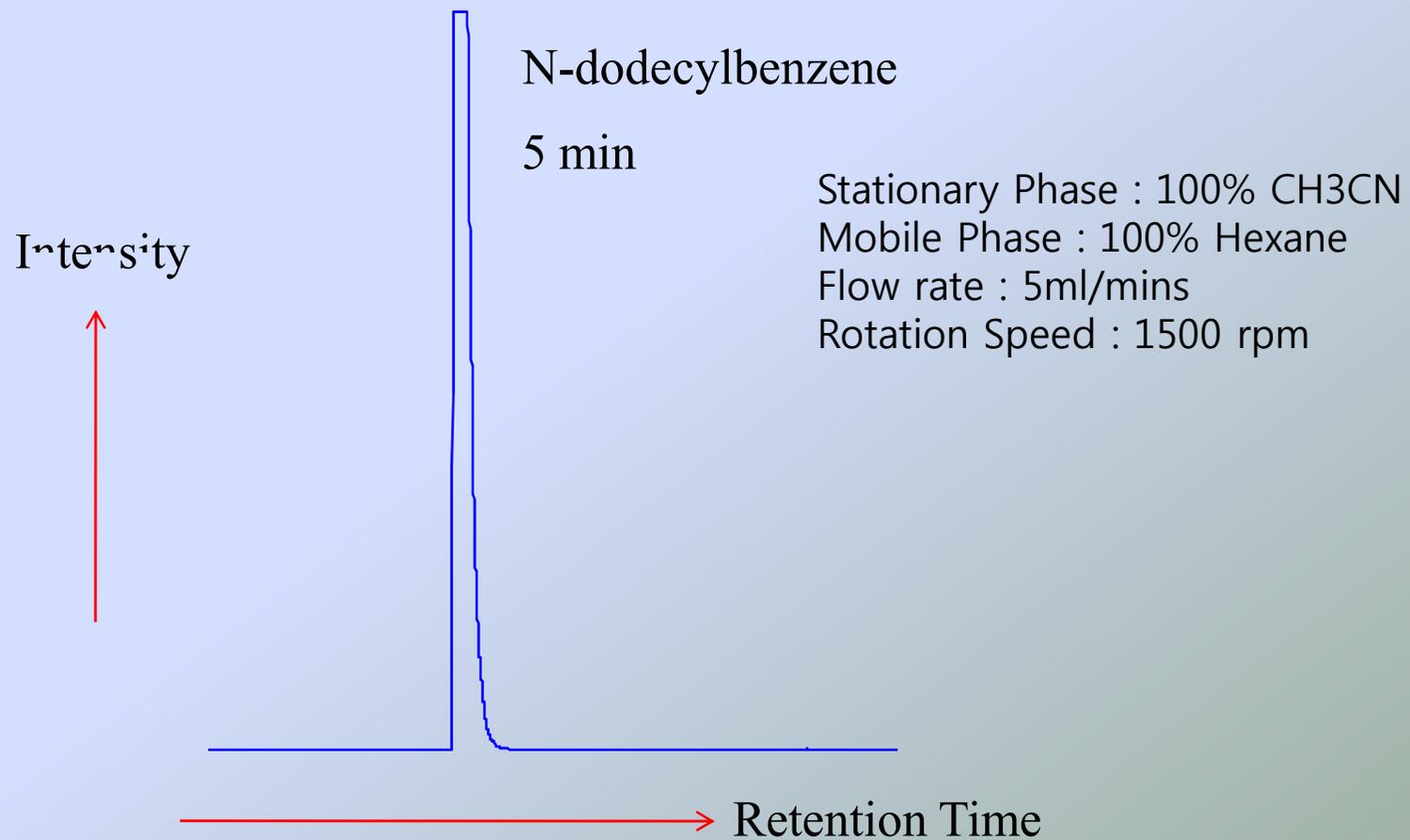
Test 실험 예

<Descending Elution and Reverse Phase Mode>



Test 실험 예

<Ascending Elution and Normal Phase Mode>



Question??

1 Peak : 15 ~ 17 mins @ 5ml/min \Rightarrow 75 ~ 85ml

4 Peak : 50 ~ 60 mins @ 5ml/min \Rightarrow 250 ~ 300ml

a. $K(1 \text{ Peak}) = ?$

$$V_r = V_m + KV_s$$

$$75 = 70 + K(160)$$

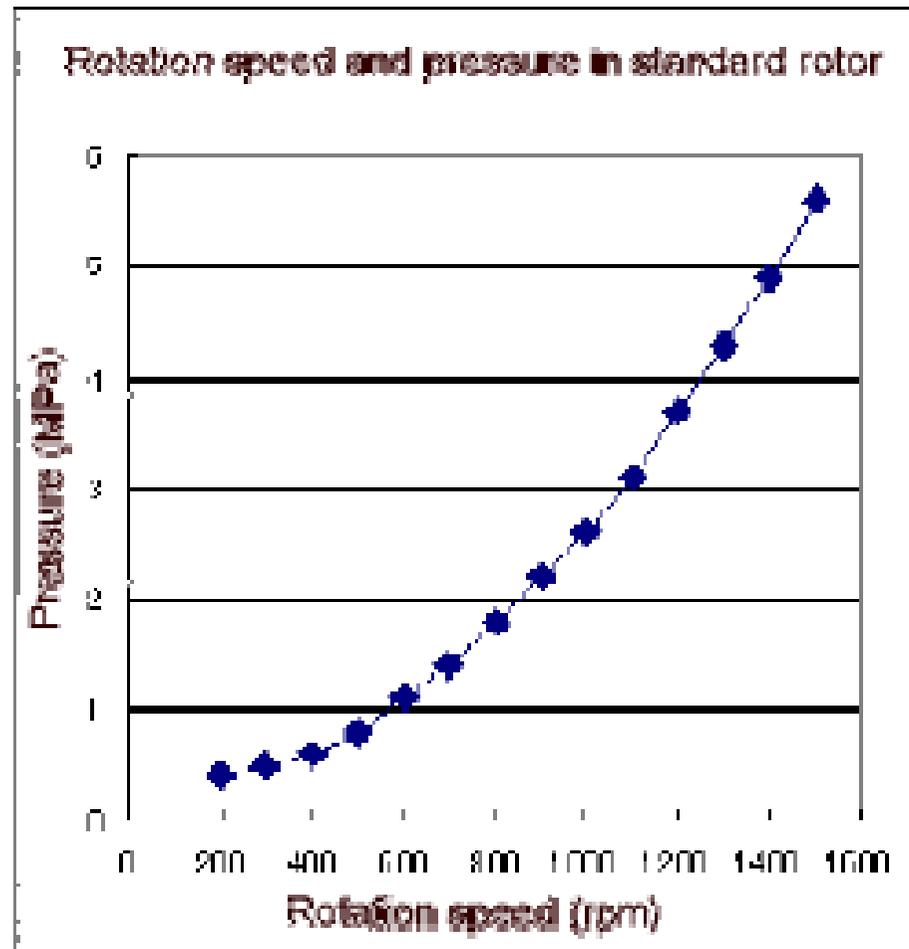
$$K = 0.03 \sim 0.09$$

b. $K(4 \text{ Peak}) = ?$

$$250 = 70 + K(160)$$

$$K = 1.12 \sim 1.43$$

Relation Between Rotation Speed and Pump Pressure



Summary

CPC는 Four combinations으로 동작한다.

Normal 이동상 < 고정상 —————> Polarity
Reverse 이동상 > 고정상

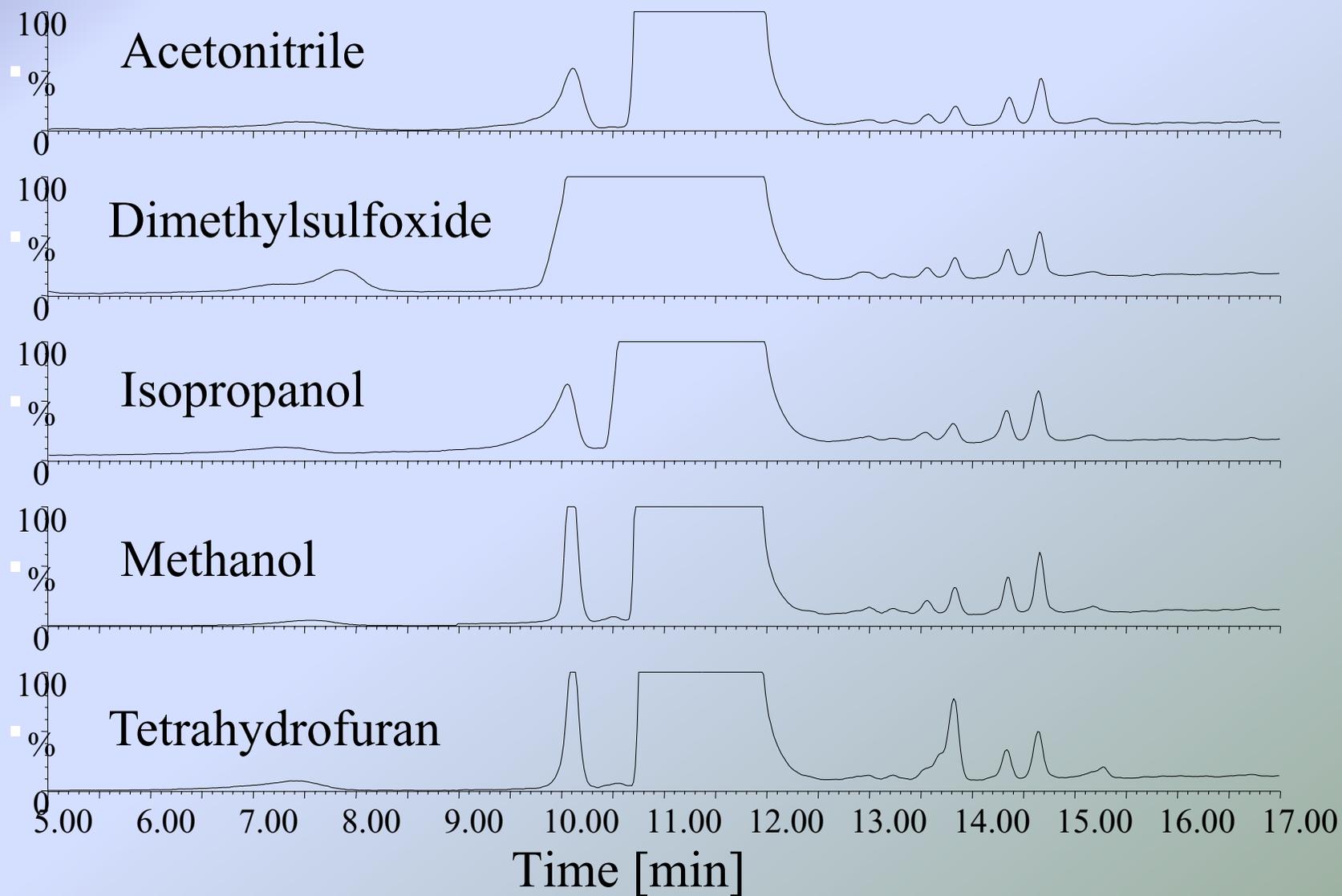
Ascending mode —————> Density
Descending mode

그리고, 물질간의 분배계수의 차이!

Solvent Polarity

Solvent	Polarity index	Miscibility
N-hexane	0.0	29
Triethylamine	1.8	26
Butanol	3.9	15
Ethyl acetate	4.3	19
Ethanol	5.2	14
Acetonitrile	6.2	11, 17
Acetic acid	6.2	14
Methanol	6.6	12
Water	9.0	

Effect of Sample Solvents



Standard two-phase solvent system (I)

(1) 높은 극성 물질(ionic groups)

- Butanol/aqueous buffer solution(1/1)

장점 : pH gradient 가능

단점 : 높은 점도 와 끊는점, 220nm 사용 불가능

(2) 높은 극성 물질(polar (non-ionic) groups)

- BuOH/organic acid/water

장점 : 높은 극성 물질

단점 : 높은 점도 와 끊는점, 220nm 사용 불가능

- BuOH/alcohol/water

장점 : 높은 극성 물질, 220nm 사용 가능

단점 : 높은 점도 와 끊는점

- EtOAc/alcohol/water

장점 : 낮은 점도 와 끊는점

단점 : 220nm 사용 불가능

Standard two-phase solvent system(II)

(3) 중간 극성 물질

(비수용성, soluble in chloroform)

- Chloroform/MeOH/water

장점 : 높은 용해도, 낮은 점도와 끓는점

단점 : 환경오염, 220nm 사용 불가능

(4) 낮은 극성 물질(hydrophobic substance)

- Hexane/acetonitrile/water

장점 : 넓은 응용, 낮은 점도와 끓는점, 220nm 사용 가능

단점 : 독성, 인화성

- Hexane/MeOH/water

장점 : 높은 용해도, 낮은 점도와 끓는점, 220nm 사용 가능

단점 : 인화성

- Hexane/EtOH/water

장점 : 독성 없음(식품류), 높은 용해도, 낮은 점도와 끓는점,
220nm 사용 가능

단점 : 인화성

Thank you and

Questions ?

Questions ?

Questions ?

Questions ?

